

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/053111 A1

(51) 国際特許分類: C12N 1/21, 9/88,
C12P 13/04 // C12N 15/60

市 緑区大野台一丁目 1 番 1 号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015882

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunihisa); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 11 日 (11.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-360564
2002 年 12 月 12 日 (12.12.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K.K.) [JP/JP]; 〒105-8518 東京都港区芝大門一丁目 1 3 番 9 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 矢崎 一史 (YAZAKI, Kazufumi) [JP/JP]; 〒606-8305 京都府京都市左京区吉田河原町一丁目 6 番 2 0 6 号 Kyoto (JP). 青木 裕史 (AOKI, Hirobumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台一丁目 1 番 1 号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 蒲池 晴美 (KAMACHI, Harumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SELECTING *ESCHERICHIA COLI* STRAIN OVEREXPRESSING FOREIGN GENE, *ESCHERICHIA COLI* MUTANT THUS SELECTED AND PROCESS FOR PRODUCING ENZYME AND COMPOUND USING THE SAME

(54) 発明の名称: 外来遺伝子高発現大腸菌株の選択方法、その方法により選択される大腸菌変異株及びそれを用いる酵素及び化合物の製造方法

(57) Abstract: A method of selecting an *Escherichia coli* strain overexpressing a foreign gene with the use of a stress-tolerance ability (for example, ability to decompose hydrogen peroxide) as an indication; an *E. coli* mutant selected by this selection method; a process for producing an enzyme by using this mutant; and a process for producing a useful compound such as an amino acid (in particular, an L-amino acid) by using the mutant. Thus, an *E. coli* mutant suffering from no decrease in gene expression level even after subculturing can be obtained and a compound can be efficiently produced with the use of a plant ammonialyase, etc.

(57) 要約: 過酸化水素分解能等のストレス耐性を指標にした外来遺伝子を高発現する大腸菌変異株の選択方法、その選択方法により選択された大腸菌変異株、その変異株による酵素の製造方法、及びその変異株を用いたアミノ酸(特にL-アミノ酸)等の有用化合物の製造方法に関する。本発明によれば、継代しても遺伝子発現が低下しない大腸菌変異株を獲得でき、植物アンモニアリアーゼ等を利用した化合物を効率的に製造することができる。

WO 2004/053111 A1

明 細 書

外来遺伝子高発現大腸菌株の選択方法、その方法により選択される大腸菌変異株及びそれを用いる酵素及び化合物の製造方法

5

技術分野

- 本発明は、外来遺伝子を高発現する大腸菌株の選択方法、その選択方法により選択される大腸菌、及びその菌株を用いる酵素及び化合物の製造方法に関する。さらに詳しくは、大腸菌内での発現が不安定な酵素遺伝子を導入した形質転換体群から当該遺伝子を安定的に高発現する突然変異株を選択する方法、この方法により選択した外来遺伝子高発現性突然変異株、及びその菌株を用いる酵素及び化合物、特にアンモニアリアーゼ及びアミノ酸の製造方法に関する。

15 背景技術

- 大腸菌を用いた外来遺伝子の発現は、極めて多くの研究と実用技術の開発が成されている分野であり、分子生物学・遺伝子工学では最も進んだ分野の一つである。現在では工業における製造手段としての重要性は極めて高く、多くのバイオ医薬が大腸菌を用いた方法により工業的に製造されている。
- 20 分子生物学の研究に最も頻用されている大腸菌の菌株は、K 1 2 株から誘導された菌株である (Swartz, 1996, In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, 2nd edition, ASM Press Washington, p.p.1693-1711)。近年では B L 2 1 のような大腸菌 B 株から誘導された菌株も多く使用されており、組換えタンパク質の産生に最も頻用されている菌株の一覧表が Wingfield, 1997
- 25 によって提示されている (Current Protocols in Protein Science. Coligan ら, Ed. John Wiley & Sons, Inc. 5.0.1-5.0.3)。

細菌宿主中でタンパク質を発現させる多数の系が文献に記載されている (Makrides, 1996, Microbiol. Rev.60 : 512-538;Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7) 。発現系は、プロモーター及びそのレギュレーター、リボソーム固定部位及びその下流で有益な遺伝子が挿入され得る制限部位、転写ターミネーターとして機能し得る構造、超発現した有益なタンパク質の品質を同時発
5 現によって改善すべく任意に存在する遺伝子、並びに、これらの組合せを宿主に導入し得る 1 つまたは複数のベクターとから構成されている。

これらのベクターは、プラスミドRNA I 及びRNA II (Polisky, 1988, Cell 55:929-932) によってコードされている 2 つの RNA の相互作用によって決定
10 される所定のコピー数で細胞中に存在している。大腸菌中の発現プラスミドのコピー数の調節に関しては、複数の戦略が文献に記載されている (Swartz, 1996, In Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology, 2nd edition, ASM Press Washington, p.p.1693-1711、Makrides, 1996, Microbiol. Rev.60 : 512-538;Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7) 。

15 大腸菌に外来遺伝子を組み込み発現させる場合、発現させようとする外来遺伝子と、これら的大腸菌とその遺伝子発現系には「相性」があり、試行錯誤法で選択されるのが一般的である。目的タンパク質が充分量得られない状況としては、生産されたタンパク質が本来有する正常な構造を取り得ず沈殿物 (インクルージョン・ボディ) となる場合や、生産されても直ちに分解さ
20 れるといった場合があるが、このような様々な問題を解決する多くの手段も文献で紹介されている (特開平 10-313863 号公報、特開平 8-140671 号公報、Makrides, 1996, Microbiol. Rev.60 : 512-538;Current Opinions in Biotechnology, 1996, 7) 。

上記のように、多くの情報と膨大な数の発現系や大腸菌株を以てしても、
25 未だ安定に発現させることが困難な遺伝子は多く、目的とする外来遺伝子を発現させてタンパク質を得ようとする時、十分な量が得られないことは非常

に多い。さらには、一度目的に合わせて作成した大腸菌菌株でも、保存中や継代する間に遺伝子発現が低下することもしばしば見られる現象であり、その原因はまだ不明な場合が多い。例えば、本明者らは、酵素アンモニアリアーゼのアミノ基付加反応を利用して各種の桂皮酸類からL-アミノ酸類を製造する方法を発明し特許出願している（特開 2003-225092 号公報）が、この研究過程においても、大腸菌を形質転換して酵素アンモニアリアーゼを発現させた場合、継代を重ねるにつれ形質転換体の活性が低下する現象が見られた。この継代による活性低下は、一般に言われる発現調節部位のメチル化やプラスミドの脱落・変異等によるものではなく、既知情報の何れによっても回避できない困難なものであった。

小スケールの培養で目的が果たせる基礎研究の場合は、新たに形質転換をやり直し、再度形質転換体を得ることで解決するのが一般的であるが、比較的大スケールで培養時間が長く、多数の継代を経る工業生産の場合、遺伝子発現の不安定さは極めて深刻な問題である。

しかしながら、遺伝子発現の安定化に関する問題としてこれまでに取り上げられ、対策が研究されているのは、プラスミドの脱落による外来遺伝子の脱落の防止、プラスミドの修飾や変異による転写不全の回避のみであり、宿主そのものの変異による発現低下の対策が論じられることは無かった。この事実は、実験室で宿主として用いられている大腸菌の多くはプラスミドの変異や修飾を行わず安定に保持するよう改変された変異株であり、これ以上の改変に関する情報は未だない状況であることによると思われる。さらにはプラスミドを含む外来遺伝子側の改変により問題を回避することが可能な場合もあり、通常は宿主大腸菌の変異に取り組むよりは技術的に実績のある外来遺伝子側の改変を試みるが多かった。しかしながら、外来遺伝子の改変は時間と労力を要する作業であり、必ずしも成功するものではない。また外来遺伝子の改変をもってしても安定化できない遺伝子の発現には対策がない

状況であった。

発明の開示

本発明の課題は、継代や保存によって発現量が低下する傾向がある発現不安定な外来遺伝子から十分なタンパク質を得る時に有用な大腸菌変異株を提供すること、及びそのような菌株を用いた工業的に重要な化学物質の製造方法を提供することにある。

さらに詳細には、プラスミドの脱落・変異・修飾以外の原因で発現が低下する外来遺伝子の発現を安定化した大腸菌変異株を提供すること、及びそのような菌株を用いた工業的に重要な化学物質の製造方法を提供することにある。

特に、プラスミドの異常を伴わずに大腸菌における発現が低下する傾向の強い植物由来フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子の発現を安定化した大腸菌変異株を提供すること、及びそのような菌株を用いて工業的に重要なアミノ酸類を製造する方法を提供することを課題とする。

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、過酸化水素分解能という、タンパク質生産には直接には関係しない一種のストレス耐性を指標にして大腸菌株の選択を行なえば、継代しても遺伝子発現が低下しない変異株を獲得できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち本発明は、継代や保存によって発現量が低下する傾向がある発現不安定な外来遺伝子から十分なタンパク質を得る時に有用な大腸菌変異株を与え、そのような菌株を用いて工業的に重要な化学物質を製造する方法を与えるものである。

すなわち、本発明は下記の大腸菌株選択方法、選択された大腸菌株、これを用いた酵素の製造方法及びその酵素を用いた有用化合物の製造方法を提供する。

- [1] ストレス応答の強さを指標として選抜することを特徴とする外来遺伝子高発現性大腸菌株の選択方法。
- [2] ストレス応答が過酸化水素分解活性である前記1に記載の選択方法。
- [3] 大腸菌に導入された際に、プラスミドの脱落や変異以外の原因により低発現化する外来遺伝子を高発現する前記1または2に記載の選択方法。
- 5 [4] ストレス応答の強さを指標として選抜された外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- [5] ストレス応答が過酸化水素分解活性である前記4に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- 10 [6] 大腸菌に導入された際に、プラスミドの脱落や変異以外の原因により低発現化する外来遺伝子を高発現する前記4または5に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- [7] 大腸菌株を30世代継代する間に発現量が2分の1まで低下する遺伝子を発現させたときに、発現量が初代の水準に維持されるかまたは向上する前記4乃至6のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- 15 [8] プラスミドの脱落や変異以外の原因により低発現化する外来遺伝子が、アンモニアリアーゼの遺伝子である前記6または7に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- [9] アンモニアリアーゼの発現系遺伝子がフェニルアラニンアンモニア
- 20 リアーゼの遺伝子である前記8に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- [10] フェニルアラニンアンモニアリアーゼの遺伝子が、植物由来である前記9に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- [11] 植物がムラサキ科ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) である前記10に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- 25 [12] 大腸菌株がK12株由来である前記4乃至11のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

[13] 大腸菌株が X L 1 - B l u e 株由来である前記 1 2 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

[14] 大腸菌株が Escherichia coli SD840 株である前記 1 3 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

- 5 [15] 大腸菌株が Escherichia coli SD840 株からクローン選択または遺伝子操作によって得られる誘導株である前記 1 4 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

[16] Escherichia coli SD840 株（受託番号：FERM BP-08546）。

- [17] 前記 4 乃至 1 5 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株
10 の外来遺伝子を発現させることを特徴とする酵素の製造方法。

[18] 前記 4 乃至 1 5 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株またはその産生する酵素を含む処理液をその酵素の基質と反応させることを特徴とする化合物の製造方法。

- [19] 酵素がアンモニアリアーゼであり、基質が不飽和カルボン酸であり、得られる化合物が L - アミノ酸および／またはその誘導体である前記 1
15 8 に記載の化合物の製造方法。

[発明の実施の形態]

(1) 高発現性大腸菌株の選択方法

- 本発明において外来遺伝子安定的高発現性大腸菌株とは、慣用の手法によ
20 って大腸菌に外来遺伝子を導入した際に相対的に発現量が大きく、さらに、その発現が安定している株を指す。発現させるべき外来遺伝子は特に限定されないが、「発現困難な外来遺伝子」を導入しようとする場合、本発明は特に有用である。ここで、「発現困難な外来遺伝子」とは、大腸菌に導入し形質を転換し当該形質転換大腸菌を継代培養したときに、継代する間に外来遺
25 伝子の発現が低下する遺伝子をいう。より詳しくは、プラスミドの脱落や変異以外の原因により低発現化する外来遺伝子であり、大腸菌の発現プラスミ

ド上に発現可能な形で組み込んで大腸菌に導入した時に、プラスミドの脱落や変異等の異常がないにもかかわらずタンパク質生産が行われない遺伝子を指す。

本発明の大腸菌変異株選択方法を、以下に詳細に説明する。なお、変異の
5 誘導等は、特に明記しない限り、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989 年発行等に記載の方法を参考にして行うことができる。

まず、大腸菌変異株の製造方法を説明する。本変異株の選抜は、発現困難な遺伝子を有する組換えベクターで宿主大腸菌を形質転換した形質転換体を用いて行う。組換えベクターの作成には大腸菌での発現制御に必要な配列を有する発現プラスミド、例えば市販の p E T、p T r c 9 9 A、p K K 2 3
3、p U C 1 8 等を用いることができる。これらの発現プラスミドの適当な
10 サイトに発現困難な遺伝子を組み換えたベクター、すなわち、大腸菌プロモーター及びそのレギュレーター、好ましくは l a c プロモーター、T r p プロモーター、T a c プロモーター等のハイブリッドプロモーター、T 5 プロモーター、T 7 プロモーター等の下流に、リボソーム固定部位と連続した発現困難な遺伝子、転写ターミネーターとして機能し得る構造およびマーカー
15 遺伝子等から構成されている大腸菌組換えベクターを構築する。

本発明において形質転換する大腸菌株は特に制限されないが、好ましくは、
20 K 1 2 株、B 株等が用いられ、生物学的封じ込めの観点から、K 1 2 株が好適に用いられる。例えば、一般的な宿主として市販されている (stratagene 社、日本国内では TOYOBO より購入可能) X L 1 — B l u e 株 (Bullock, Fernandez & Short, 1987, Biotechniques, 5:376-378)、J M 1 0 9 株 (TaKaRa より購入可能)、H B 1 0 1 株等、広く大腸菌宿主として用いられ、形質の安定した株
25 を用いることができる。

通常用いられる大腸菌が生育可能な培地に、使用する組換えベクターに対

応した形質転換体選抜物質（例えば、アンピシリン等の抗生物質）を適量加え、さらに寒天を加えて平板化した寒天平板培地、好ましくはM9 グルコースプレートに、形質転換体を塗布し、20℃～40℃、好ましくは25℃～35℃、より好ましくは25℃でコロニーが明確に形成されるまで16時間5～72時間、好ましくは24時間～48時間培養する。

発現困難な遺伝子を有する形質転換体は、多くの場合不均一なコロニーを形成する。本発明では、この形質転換体菌株の中からストレス応答の強さを指標として選抜を行なう。利用可能なストレス応答のタイプは特に限定されないが、利用可能なものとしては、過酸化水素分解活性、熱処理後の生育回復性（熱耐性）等が挙げられる。この中でも過酸化水素分解活性は、コロニーに微量の過酸化水素液を反応させた時、過酸化水素を分解して酸素を発生する量の大小でストレス応答の強さを目視により見分けることができるので好ましい。

必要であれば、一時選抜と同じ指標を以てさらに選抜を繰り返してもよい。また、選抜に際しては、ストレス応答を示す株の中で、コロニーの色調が他と比較して白色に近いものや、コロニー径が有意に小さいものが特に選抜対象として好ましい。また、二次選抜以降の株について、既知の手法による生成タンパク質の解析を併用してさらなる選抜を行なってもよい。

得られた変異株を薬剤圧のない培地で継代することにより、選択時に使用した組み換えベクターを脱落させることができ、これにより宿主大腸菌変株を得る。

得られた宿主大腸菌変異株の継代安定性は、菌株が生育する通常の条件で薬剤による選択圧をかけずに所定の分裂回数が得られるまで継代培養した後、外来遺伝子の発現を見ることで評価することができる。例えば、LBブロスのごとき栄養培地に、初期濁度が0.1になる量の被検菌株を植菌し、濁度3以上に達するまで培養すると、約5世代の継代数となる。同じ条件で6回

の培養を繰り返すことで30世代継代の菌体を得ることができ、この菌体の外来遺伝子発現を、外来遺伝子に由来するタンパク質の生産量等を指標にして評価すればよい。

- 変異株の選抜中に特に変異処理を施す必要はないが、用いる宿主大腸菌によつては通常用いる変異処理、例えば紫外線照射、変異薬剤処理等を施すことが好適な場合もある。

こうして得られた本発明の大腸菌変異株は、親株と比べて成長速度、形質転換方法及び保存方法等に差異はなく、25℃～37℃の温度範囲、通常の栄養培地において、通常の操作で取り扱いができる。

- 10 ストレス応答性の高い株が高発現・高活性を持つ理由は明らかではないが、外来遺伝子の発現がストレスの一種であることと関係していると思われる。もつとも、高ストレス応答性は、外来遺伝子の発現を抑圧してストレスを軽減する方向に働くとも考えられるから、ストレス応答性の高い株が高発現・高活性を持つことを見出した本発明の知見は全く予想外のものである。

15 (2) 安定的高発現性大腸菌株

本発明は上記の方法により選択される大腸菌株を提供する。本発明により選択される大腸菌株は、上記の通り、実質的に任意の大腸菌株の任意の形質転換株における安定的高発現性大腸菌株である。

- 20 このようにして得られる変異株の例としては、*Escherichia coli* SD840 株が挙げられる。これは、XL1-BLue株を親株とし、植物フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝子を導入した形質転換株から上記の手法により選抜された安定的高発現性大腸菌株であり、親株XL1-BLue株の10倍以上の外来遺伝子由来のタンパク質を生成し、さらに形質転換体の30世代の継代によって変化することなく安定に発現する。

- 25 *Escherichia coli* SD840 株は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号 305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託

センターに寄託し（受託日：2002年9月27日，受託番号：FERMP-19047）、
2003年11月10日付で国際寄託に移管した（国際受託番号：FERMBP-08546）。

本発明の選択方法により取得された大腸菌変異株の一つであるSD840株の顕著な特徴を親株と対比して以下に挙げる。

表 1

| 特徴 | XL1-Blue | SD840株 |
|---------------------|----------|--------|
| 色素生産 | ＋（淡黄色） | －（白色） |
| コロニー光沢 | 粗 | 光沢 |
| グリセロール資化性 | ＋ | － |
| コハク酸資化性 | ＋ | － |
| 対数増殖期の 過酸化水素分解活性 | 低 | 高 |

5

さらに本発明の大腸菌変異株は、生育後期（定常期以降）のゲノム解析の結果、親株に比較して高い発現をしている特徴的な遺伝子によってもその性質が示される。これらの遺伝子には未だ機能が特定されていないものも含まれ、発現困難な遺伝子が安定発現される原因であるものと結果であるものが混在しているが、本変異株の一つであるSD840株の性質を示すものである。有意に発現している特徴的な遺伝子は、oppA、ompA、tufB、tufA、fusA、gapA、rpsA、ahpC、infC、katE、ydiH、lacI、icdA、oppC、rpoB、ynhA、ompX、dnaJ、oppB、yceD、dnaK、aco2、cld、zipA、minC、galF、gnd、yafK、fabB、trmD、cysK、cydA、hslV、pepN、oppF、rpoC、ompF、rpoA、pheS、rpsB、oppD、pepD、serS、topA、grpE、yeaF、asnB、serC、ppiB、tolB、ycbK、ybeY、prsA、rpsG、gyrA、ahpF、tyrS、pheA、clpB、

15

rpsL, cydB, asps, ybdR, ftsZ, aroG, rplJ,
 tsf, rpsP, Cnt5, rplA, aceA, mdh, ybgF, a
 dd, yjjZ, rplC, (erfK), dcp, glf, amn, ac
 eB, rpsD, mopB, gpt, yaiL, rpoD, ynfB, pg
 5 mU, rplE, rfbB, seqA, asnS, zwf, eda, fab
 Z, otsA, Cnt5, lrp, ychB, pal, rplY, folE,
 rplN, glnS, rimM, yefG, ydcF, rlpA, yacA,
 fabD, Cnt5, rfbD, dicA, metG, ppc, (yeeT),
 yafJ, aspC, pyrC, leuS, ycbL, rplT, ykfF,
 10 sodB, 430#6, rnb, rpsE, yebC, rpsJ, 664#
 11, yliJ, ycfC, pnp, rfbA, ybiC, rplS, tr
 pA, hupB, hisC, rplB, rpsH, pheT, yefI, l
 pdA, serA, lolA, wbbJ, leuC, rlpB, rplD,
 sucB, fkpB/slpA, ygfB, rplX, htpG, mopA,
 15 pntA, rpsF, infB, yciI, (yhhX), moaB, yc
 jX, glyQ, yagU, tolC, gcvR, gdhA, yadF, p
 urB, speE, (yefJ), yggB, accA, ybiT, moa
 E, rpsK, yleA, mukE/kicA, prfB, ybaD, ri
 bF, hslU, adk, rpsM, rplQ, nfnB, yfhF, yf
 20 iB, yaeS/uppS/rth, aroA, dapD, 221#15,
 tktA, (cybB), yhbH, hisH, pbpB/ftsI, an
 sA, gltB, bcp, gm4D, yoaB, 232#7, ugd, ma
 p, rfaL, rplW, rfbC, rplK, rpsC, glyS, sp
 eG, guaA, rpmB, rplF, ptsN, smtA, rpmA, y
 25 kgA, ompT, rplU, lspA, exoX, hisI, dacA,
 fabF, ycbW, sucD, 120#5, kdgK, trmU, lon,

n t p A、y c i M、t o l Q、r f a P、r f a I、u p 1 8、y f g M、
 r p 1 R、g u a B、r i b H、a t p B、y a e L、a t o E、y a g B、
 p d x H、c s p J、r p 1 M、r p 1 O、p o t D、r f b X、y r f H
 / h s 1 R、f c l / w c a G、t r x B、p l s X、g l t X、d n a A、
 5 y d f G、p r i B、r p s N、y h c N、m a n A、s u r A、p u r E、
 s e c Y / p r 1 A、d x r、y e a J、y f c B、d l d、c y s P、f
 b p、3 2 3 # 1、i n t D、h u p A、f t s L、a c e K、c o d A等
 が挙げられる。

(3) 安定的高発現性大腸菌株による酵素（タンパク質）の製造方法

10 さらに、本発明は、前記大腸菌変異株を用いる外来タンパク質、典型的に
 は酵素の製造方法を提供する。

本発明の酵素その他のタンパク質の製造方法では、前記大腸菌変異株を培
 養し、必要があれば発現誘導を行う。形質転換体の培養方法は、通常の方法
 が用いられ、培地は栄養培地、合成培地いずれでも構わない。培養温度は、
 15 20～42℃の範囲内で任意に選ばれるが、30℃付近が最も好ましい。大
 腸菌変異株からの外来タンパク質の回収及び精製は、形質転換体を破碎して
 遠心分離し、上清を回収し、ゲル濾過や各種のカラムクロマトグラフィー等、
 タンパク質の精製に使用されている通常の方法（例えば、(Current Protocols in
 Protein Science (ed. Coligan, J. E. et al.), John Wiley and Sons, Inc., Chapter 6) で精
 20 製すればよい。また、目的タンパク質がペリプラズムに存在する場合には、
 Willsky らの方法 (J. Bacteriol., 127, 595-609 (1976)) 等を参考にして精製するこ
 とができる。

本発明の製造方法は、大腸菌に導入する遺伝子によって製造され得る任意
 の酵素その他の外来タンパク質について適用できるが、特に、従来、大腸菌
 25 内で発現困難であった遺伝子の発現により製造される酵素その他の外来タン
 パク質の製造方法として有用である。

こうした酵素その他の外来タンパク質としては、例えば、植物フェニルアラニン アンモニアリアーゼ等が挙げられる。特に植物フェニルアラニン アンモニアリアーゼは、例えばSD840株において親株XL1-Blue株の10倍以上の外来遺伝子由来のタンパク質を生成し、さらに形質転換体の30世代の継代によって変化することなく安定に発現する、非常に好ましい例である。

なお、遺伝子発現によって生成された酵素その他のタンパク質の定量は、通常のSDS-PAGE、抗体を用いたウエスタンブロットティング法等により行うことができる。タンパク質が酵素である場合は活性測定等により行うこともできる。

(4) アミノ酸等の製造方法

さらに、本発明は、前記大腸菌変異株を用いる有用物質の生産法を提供する。前記大腸菌変異株を前記と同様の方法で培養し、必要があれば発現誘導を行う。この培養液から得られる大腸菌変異株菌体、またはその処理物を目的の物質を与える基質物質と反応させ、生成物を得ることにより、野生株を用いた場合に対して、有意に効率的な物質生産を行うことができる。

本発明により生産される有用物質は大腸菌変異株が生産する酵素の種類により、例えば、酵素が分解酵素であれば基質の分解物、酵素が転移酵素であれば基質に所定の基が付加された化合物または基質から所定の基が除去された化合物等が得られる。例えば、アンモニアリアーゼはアンモニアの存在下に、不飽和カルボン酸の不飽和結合にアンモニアを付加してアミノ酸を生成する。

本発明によれば、植物フェニルアラニン アンモニアリアーゼを高発現するSD840株を用いて、アンモニア存在下、桂皮酸類と反応させることにより、対応する各種の光学活性なアミノ酸類を生産することができる。SD840株は継代による発現低下等の問題が無く、多くの継代を要するスケール

アップ製造において、親株ではなし得なかった安定高生産を実現することができる。

図面の簡単な説明

- 5 図1は、実施例で使用したプラスミドの制限地図である。
図2は、SDS-PAGEとウェスタンブロッティングの結果である。

発明を実施するための最良の形態

- 以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの
10 実施例により何ら限定されるものではない。特に明記しない限り、以下の実施例の条件及び操作は、Sambrook, J. 著、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989年発行に記載の方法による。

- なお実施例において酵素活性を測定する場合は、0.1M ホウ酸ナトリウム緩
15 衝液 pH8.5、基質としてL-フェニルアラニン10mMの存在下、30℃において毎分1 μ molの桂皮酸を遊離する酵素量を1ユニット(U)と定義した。

酵素タンパク質量の定量は、ビウレット法により、ウシ血清アルブミンを基準として定量した。

- 20 また桂皮酸およびL-フェニルアラニンは、反応液を以下の条件下、HPLCで分離定量した。

カラム: Shodex (登録商標) RS Pak NN-614 (昭和電工株式会社製)

カラム温度: 40℃

- 25 溶離液: アセトニトリル/水/50mM H_3PO_4 - KH_2PO_4 水溶液 (pH3) = 20/70/10

流速：1.0ml/min

検出：UV 210nmの吸収による

形質転換体の培養には、M9培地（リン酸水素二ナトリウム 0.6%、リン酸二水素カリウム 0.3%、塩化ナトリウム 0.05%、塩化アンモニウム 0.1%、グルコース 0.1%、硫酸マグネシウム 1mM、チアミン塩酸塩 0.001%、塩化カルシウム 0.1mM、pH7.4）にアンピシリン 100ppmを加えたものか、LB培地（ポリペプトン 1%、酵母エキス 0.5%、塩化ナトリウム 1%）にアンピシリン 100ppmを加えた培地を用いた。用途に応じて、各培地に 2%寒天を加えて固化した寒天平板培地を用いた。

- 10 形質転換体の酵素活性測定には、上記培地 5～100ml で 25℃、38時間以上培養した培養液から遠心分離によって集菌した菌体を、培養液と等容量の生理食塩水で菌体を洗浄した後、この菌体を培養液の半容量の反応液（4Mアンモニア/炭酸アンモニウム（pH10.3））に懸濁し、終濃度 0.2%（2000mg/L）の基質を加えて 30℃で振盪しながら反応させた。この反応液の一部を適当な時間（通常 2～6 時間の間）に取り、菌体を遠心分離して除き、上清を HPLC 分析して生成物量を定量した。

実施例 1：組み換えベクターの作成

- 本実施例で用いた植物フェニルアラニン アンモニアリアーゼ遺伝子の取得法に関しては、本発明者らの先出願（特開 2003-225092 号公報）に詳細に記載されている。特開 2003-225092 号公報に記載の組み換えベクターを用いることもできるが、ここでは、矢崎らの報告（Biosci. Biotech. Biochem. (1997), 61(12), 1995-2003）に記載されている組み換えベクター pQEPA L2 より、His-tagコード配列を削除したプラスミド pQEPA L2/ΔHis6（図 1 参照）を作成して用いた。

なお、図 1 中、各記号の意味は以下の通りである。PT5：T5プロモーター

ター; lac: lacオペレーター; RBSII: 合成リボソーム結合サイト;
 pal: フェニルアラニン アンモニアリアーゼ遺伝子; tO/T1: 転写ターミネーター; 6×His: His-tagコード配列; ORI: 複製起点;
 bla: β-ラクタマーゼ遺伝子=アンピシリン耐性遺伝子。

- 5 pQEPAL2よりHis-tagコード配列を削除するには、組み換えベクターのHis-tagコード配列の前後の位置に相当する、配列番号1に記載のプライマー(5'側; 18merのオリゴヌクレオチド)及び配列番号2に記載のプライマー(3'側; 18merのオリゴヌクレオチド)を合成し、His-tagコード配列以外の部分を下記条件のPCRで増幅し、末端平滑化およびリン酸化処理の後、セルフライゲーションすることによって作成した。下記配列番号1のプライマーでは、目的物であることを容易に確認できるように、ベクター由来のHindIIIサイトの一つが消失するよう1塩基置換を施してある。

[PCR条件]

- 15 反応液組成:

| | |
|------------|-----------|
| 鋳型プラスミド | 1 μg |
| プライマー | 各100 pmol |
| dNTP溶液 | 各1 mM |
| 10x反応バッファー | 10 μl |

- 20 ExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) 2.5U 計50 μl

反応条件:

| | |
|--------|----------|
| 熱変性 | 94℃、30秒 |
| アニーリング | 55℃、60秒 |
| 伸長 | 72℃、300秒 |

- 25 サイクル数 30回

以上の条件によりベクター断片の増幅を行ったところ、理論的に算出され

る断片長約 5.5 k b の断片がほぼ特異的に増幅された。この P C R 反応液を用いて、TaKaRa BKL Kit（宝酒造社製）の標準的なプロトコルに従って断片をセルフライゲーションした。続いてライゲーション溶液で宿主大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、アンピシリン 1 0 0 p p m を含む L B 寒天平板培地に
5 塗布し、3 5 °C で 2 4 時間培養した。

形成されたコロニー 6 株より、QIAprep Miniprep Kit（QIAGEN 社製）を用いてプラスミドを調整し、制限酵素 H i n d III によるカットパターンを調べた。この結果、6 株より抽出されたプラスミドは全て目的の H i s - t a g コード配列が除かれたプラスミドであることが確認できた。

10

実施例 2 : P A L （フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）活性を示す形質転換体の作成

実施例 1 で得た p Q E P A L 2 / Δ H i s 6 で形質転換した大腸菌 X L 1 - B l u e 株を、イソプロピルー β - D - チオガラクトピラノシド（I P T G）0.1mM およびアンピシリン 1 0 0 p p m を含む L B 寒天平板培地に塗布
15 し、2 5 °C で 4 8 時間培養すると様々な大きさのコロニーが生成した。これらのコロニーから任意に各 2 4 株を選択し、L B 培地 5 m l で培養した。培養開始 3 4 時間後、イソプロピルー β - D - チオガラクトピラノシド（I P T G）を 0.1mM になるよう培養液に加えてさらに 4 時間培養した。得られた
20 培養液をそれぞれ遠心分離して集菌し、得られた菌体を上記の方法で反応に供した。3 時間反応後の生成物を H P L C により定量したところ、表 2 に示すように、各形質転換体の活性は未分離の形質転換体株の活性を 1 として、相対活性 0 ~ 4 倍の範囲で様々な活性を示した。

表 2

| コロニーNo. | 相対活性 |
|---------|------|
| 未分離 | 1.0 |
| 1 | 1.3 |
| 2 | 1.0 |
| 3 | 0.6 |
| 4 | 0.2 |
| 5 | 0.2 |
| 6 | 0.2 |
| 7 | 3.0 |
| 8 | 3.7 |
| 9 | 0 |
| 10 | 2.8 |
| 11 | 0.3 |
| 12 | 0 |
| 13 | 1.0 |
| 14 | 1.4 |
| 15 | 1.3 |
| 16 | 0 |
| 17 | 0.9 |
| 18 | 1.5 |
| 19 | 1.9 |
| 20 | 0.9 |
| 21 | 1.0 |
| 22 | 0.3 |
| 23 | 3.7 |
| 24 | 0.3 |

実施例 3 : 単コロニー分離と継代後の形質転換体の活性

実施例 2 で得たコロニー 24 株全てを、イソプロピルー β -D-チオガラ
5 クトピラノシド (IPTG) 0.1mM およびアンピシリン 100 ppm を含む
LB 寒天平板培地に面線し、25℃で48時間培養した。この分離コロニー
を、実施例 2 と同様に培養して活性測定したところ、表 3 に示すように、活
性に変動する株が出現した。

表 3

| コロニーNo. | 相対活性 | 挙動 |
|---------|------|----|
| 未分離 | 1.0 | |
| 1 | 1.2 | → |
| 2 | 0.9 | ↓ |
| 3 | 0.6 | → |
| 4 | 0 | → |
| 5 | 0.2 | → |
| 6 | 0.2 | → |
| 7 | 5.6 | ↑ |
| 8 | 5.8 | ↑ |
| 9 | 0 | → |
| 10 | 5.5 | ↑ |
| 11 | 0.1 | ↓ |
| 12 | 0 | ↓ |
| 13 | 0.9 | ↓ |
| 14 | 1.2 | ↓ |
| 15 | 1.0 | ↓ |
| 16 | 0 | ↓ |
| 17 | 0.7 | ↓ |
| 18 | 1.5 | → |
| 19 | 2.6 | ↑ |
| 20 | 0.8 | ↓ |
| 21 | 0.9 | → |
| 22 | 0.3 | → |
| 23 | 5.8 | ↑ |
| 24 | 0.3 | → |

本活性測定で高活性を示した株を、他の株と比較すると、No.7 コロニーは生育不良であったが、No.8, 10, 23 株は何れも有意に色調が白く、かつ表面光沢を帯び、形状の異なる株であった。

5

実施例4：ストレス応答性による高活性株の識別法

目視によるノイズの多い識別法ではなく、容易かつ確実に識別可能な特徴がないかを調べるため、各株の過酸化水素分解活性、熱処理後の生育回復性

(熱耐性)を調べた。過酸化水素分解活性は、画線培養したLB寒天平板培地上の菌体に、数 μ lの過酸化水素水を加え、平板上で気泡の発生状況を観察した。

熱耐性試験は、寒天平板上の菌体を上記M9培地で16時間培養した後遠心で集菌し、生理食塩水に懸濁し8時間穏やかに振とうして休止菌体とした。この休止菌体を55℃で2分間処理した後、アンピシリン100ppmを含むLB寒天平板培地に画線して25℃で培養した。

この試験の結果、高活性株は全て一般～低活性な株より生育初期から過酸化水素分解活性が高い傾向が認められた。一方、熱耐性は3株中2株で高い傾向が見られたが、1株は通常株と同様生育不良であった。そこでコロニー形状と生育初期の過酸化水素分解活性を指標に高活性株の分離選抜を試みた。

実施例5：高活性形質転換体の分離選抜

実施例1と同様にして、pQEPAL2/ Δ His6で形質転換した大腸菌XL1-Blue株を、イソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)0.1mMおよびアンピシリン100ppmを含むLB寒天平板培地に塗布し、25℃で48時間培養した。形成された各コロニーの一部に接するように30%過酸化水素水1 μ lを添加し、分解による発泡を観察したところ、幾つかのコロニーで旺盛な発泡が観察された。この中からコロニー24株を単離し、アンピシリン100ppmを含むM9寒天平板培地に取り、25℃で48時間培養した。

単離した24株の活性を実施例2と同様にして培養し、活性を測定したところ、表4に示すように全ての株で高い活性が確認された。この中から、比較的生育状況も良く、コロニー形成も明確な3株を選択した。

表 4

| コロニーNo. | 相対活性 |
|---------|------|
| 未分離 | 1.0 |
| 1 | 5.9 |
| 2 | 5.6 |
| 3 | 5.7 |
| 4 | 6.1 |
| 5 | 6.2 |
| 6 | 5.5 |
| 7 | 5.6 |
| 8 | 6.0 |
| 9 | 6.1 |
| 10 | 5.4 |
| 11 | 5.8 |
| 12 | 5.2 |
| 13 | 6.2 |
| 14 | 6.1 |
| 15 | 5.3 |
| 16 | 6.3 |
| 17 | 5.9 |
| 18 | 5.6 |
| 19 | 6.2 |
| 20 | 6.3 |
| 21 | 6.3 |
| 22 | 5.7 |
| 23 | 5.9 |
| 24 | 5.4 |

実施例 6 : 高活性株の継代安定性

選択した高活性株 No.16, 20, 21 株を、それぞれアンピシリン 100 ppm を
 5 含む LB 寒天平板培地に画線し、25℃で48時間培養した。この培養菌体
 から、同じ LB 寒天平板培地に画線培養することを5回繰り返した。各植え
 継ぎの間に、実施例 2 と同様にして培養し、植え継ぎ毎の活性の変動を確認
 した。表 5 に示すように、これらの株のうち2株 (No.16 及び 20) については、
 植え継ぎによる活性変動は小さく、安定した形質として高活性を示すことが
 10 確認された。

表 5

| コロニーNo. | 相対活性 | | | | | |
|---------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 植継回数 | 開始時 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 未分離 | 1.0 | 0.5 | | | | |
| 16 | 6.3 | 5.8 | 6.0 | 6.1 | 6.0 | 5.9 |
| 20 | 6.3 | 6.3 | 5.9 | 6.2 | 6.1 | 6.3 |
| 21 | 6.3 | 5.9 | 5.8 | 5.5 | 5.0 | 5.2 |

実施例 7：高活性株のプラスミド確認

5 活性の変化がプラスミドの変異に由来するものか、宿主の変異によるものかを調べる目的で、実施例 6 で安定高活性を示すことが判った 2 株より No.16 株を選択し、その保持プラスミドを調整し、その全塩基配列（約 5.5 k b）および再形質転換体の活性を調べた。

QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN 社製）を用いてプラスミドを抽出し、全塩基配列を両鎖に対するジーンウォーキング解析により解読した。配列決定は DNA シーケンサー model377 ver.3.0 の標準的な使用法、すなわち標準的な PCR 反応および泳動・データ解析方法によって決定した。決定した各部分配列の配列結合は核酸配列自動結合ソフトウェア GENETYX-WIN/ATSQ（ソフトウェア開発株式会社製）により行った。その結果、全配列に渡って置換・脱落等の異常はないことが確認された。

15 同じ上記プラスミドを用いて、大腸菌 X L 1 - B l u e 株を形質転換し、イソプロピルー β - D - チオガラクトピラノシド（IPTG）0.1mM およびアンピシリン 100 p p m を含む LB 寒天平板培地に塗布し、25℃で48時間培養したところ、実施例 2 に記載したのと同様、様々な大きさのコロニーが生成した。本コロニーから任意に各 24 株を選択し、実施例 2 と同様に
20 して培養し活性を測定したところ、表 6 に示すように、各形質転換体の活性は未分離の形質転換体株の活性を 1 として、相対活性 0 ～ 3 倍の範囲で様々な活性を示した。

これらの事実より、高活性株から抽出したプラスミドは選抜分離前のプラスミドと全く同じものであり、高活性化はプラスミドの変化によるものではなく、宿主大腸菌株の変化であることが確認された。

表 6

| コロニーNo. | 相対活性 |
|---------|------|
| 未分離 | 1.0 |
| 1 | 0 |
| 2 | 1.2 |
| 3 | 0.2 |
| 4 | 0.4 |
| 5 | 1.7 |
| 6 | 2.7 |
| 7 | 3.2 |
| 8 | 0 |
| 9 | 2.2 |
| 10 | 2.8 |
| 11 | 0.1 |
| 12 | 1.0 |
| 13 | 0.8 |
| 14 | 1.9 |
| 15 | 2.9 |
| 16 | 0 |
| 17 | 0.5 |
| 18 | 0.2 |
| 19 | 0 |
| 20 | 0.1 |
| 21 | 1.7 |
| 22 | 3.1 |
| 23 | 1.1 |
| 24 | 0 |

5

実施例 8 : 高活性株のタンパク質生産の確認

実施例 6 で得られた高活性株 No.16 と、実施例 7 のコロニー No.24 及び No.12 株を、実施例 2 に記載の方法に従い、アンピシリン 100 ppm を含む LB 培地 5 ml で培養した。培養 34 時間後イソプロピルー β -D-チオガラクト

トピラノシド (IPTG) 0.1mMを添加し、さらに4時間培養した。得られた培養液の濁度 (660nm) を測定し、ほぼ同じ濁度であることを確認後、培養液の 0.1ml を遠心分離して集菌した。この菌体を 0.15ml の生理食塩水に懸濁し、4×SDS 泳動電気泳動サンプル処理液 (1M Tris-HCl (pH6.8) 2.1ml、SDS 860mg、2-メルカプトエタノール 2ml、グリセロール 2.8ml、BPB 1mg を混合し、脱イオン水で 10ml にしたもの) 0.05ml を加え、良く混合した後、100℃で5分間煮沸した。

処理液を遠心 (12,000rpm×5分) して沈殿物を除いた上清 10μl をそれぞれ 10～20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2連) に供した。

10 分離後のアクリルアミドゲルの一方はCBB染色液でタンパク質染色した。他方のゲルは、標準的な条件のエレクトロブロッティングによりニトロセルロース膜へタンパク質を転写した後、抗PAL (兎) 抗体を一次抗体として、Phototope-HRP Western Blot Detection System (Amersham 社製) の標準的な手法に従い、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、活性の高低はPAL (フェニルアラニンアンモニアリアーゼ) タンパク質の生成量と一致することが確認された (図2参照)。

実施例9：高活性株よりプラスミド除去

実施例6で得られた高活性株 No.16 をテトラサイクリン 20ppmを含む LB 培地 5ml、35℃、24時間培養した後、培養液の一部を植え継ぎ同条件で培養行うことを10日間繰り返して行った。10日目の培養液をLB寒天平板培地に塗布し、35℃で24時間培養し、コロニーを形成させた。

形成されたコロニーを、任意に50個選択し、テトラサイクリン 20ppmとアンピシリン 100ppmを含むLB寒天平板培地と、テトラサイクリン 20ppmのみ含むLB寒天平板培地上に植菌し、25℃、48時間培養した。アンピシリン含有培地で生育せず、含有しない培地で生育する株を単

離し、Escherichia coli SD840 株と命名した。

実施例 10：高活性株を用いた反応

- 実施例 6 で得た高活性株 No.16 を、実施例 2 に記載の方法に従い、アンピシリン 100 ppm を含む LB 培地 100 ml で培養した。この培養液をさらにアンピシリン 100 ppm とイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 0.1mM を含む LB 培地 2 l を入れた 5 L ジャーファーマンターに植菌し、30℃、800 rpm、通気 1 ml/min. で 38 時間通気攪拌培養した。
- 10 定常期の培養液を遠心分離して得た菌体を、4M アンモニア/炭酸アンモニウム (pH 10.3) 1 L に再懸濁し、20 g の桂皮酸を加え、30℃、800 rpm で攪拌しながら反応を行った。反応液の一部を 1 時間毎に取り、反応液中に生じた L-フェニルアラニンを HPLC により定量した。基質濃度が約 2 % を保つよう基質を逐次添加しながら反応を継続して行ったところ、約 3
- 15 時間で反応液中に約 3.5% の L-フェニルアラニンが蓄積した。

産業上の利用可能性

- 本発明の選択方法によれば、外来遺伝子を安定的かつ高水準で発現する大腸菌、特に大腸菌内で発現困難な遺伝子を安定的かつ高水準で発現する大腸菌を容易かつ確実に選択できる。植物由来アンモニアリアーゼは大腸菌内で発現困難な遺伝子と考えられてきたが、本発明の方法によれば、植物由来アンモニアリアーゼ遺伝子を安定的に高発現できる。従って、各種不飽和カルボン酸にアミノ基を付加して L-アミノ酸やアントシアニン等の化合物を合成するのに有用である。

請求の範囲

1. ストレス応答の強さを指標として選抜することを特徴とする外来遺伝子高発現性大腸菌株の選択方法。
- 5 2. ストレス応答が過酸化水素分解活性である請求の範囲 1 に記載の選択方法。
3. 大腸菌に導入された際に、プラスミドの脱落や変異以外の原因により低
- 10 発現化する外来遺伝子を高発現する請求の範囲 1 または 2 に記載の選択方法。
4. ストレス応答の強さを指標として選抜された外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- 15 5. ストレス応答が過酸化水素分解活性である請求の範囲 4 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
6. 大腸菌に導入された際に、プラスミドの脱落や変異以外の原因により低
- 20 発現化する外来遺伝子を高発現する請求の範囲 4 または 5 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
7. 大腸菌株を 30 世代継代する間に発現量が 2 分の 1 まで低下する遺伝子を発現させたときに、発現量が初代の水準に維持されるかまたは向上する請求の範囲 4 乃至 6 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。
- 25 8. プラスミドの脱落や変異以外の原因により低発現化する外来遺伝子が、

アンモニアリアーゼの遺伝子である請求の範囲 6 または 7 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

9. アンモニアリアーゼの発現系遺伝子がフェニルアラニンアンモニアリアーゼの遺伝子である請求の範囲 8 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

10. フェニルアラニンアンモニアリアーゼの遺伝子が、植物由来である請求の範囲 9 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

- 10 11. 植物がムラサキ科ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) である請求の範囲 10 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

12. 大腸菌株が K 12 株由来である請求の範囲 4 乃至 11 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

15

13. 大腸菌株が X L 1 - B l u e 株由来である請求の範囲 12 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

14. 大腸菌株が *Escherichia coli* SD840 株である請求の範囲 13 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

20

15. 大腸菌株が *Escherichia coli* SD840 株からクローン選択または遺伝子操作によって得られる誘導株である請求の範囲 14 に記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株。

25

16. *Escherichia coli* SD840 株 (受託番号: FERM BP-08546)。

17. 請求の範囲 4 乃至 15 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株の外来遺伝子を発現させることを特徴とする酵素の製造方法。
- 5 18. 請求の範囲 4 乃至 15 のいずれかに記載の外来遺伝子高発現性大腸菌株またはその産生する酵素を含む処理液をその酵素の基質と反応させることを特徴とする化合物の製造方法。
19. 酵素がアンモニアリアーゼであり、基質が不飽和カルボン酸であり、
- 10 得られる化合物がL-アミノ酸および／またはその誘導体である請求の範囲 18 に記載の化合物の製造方法。

図 1

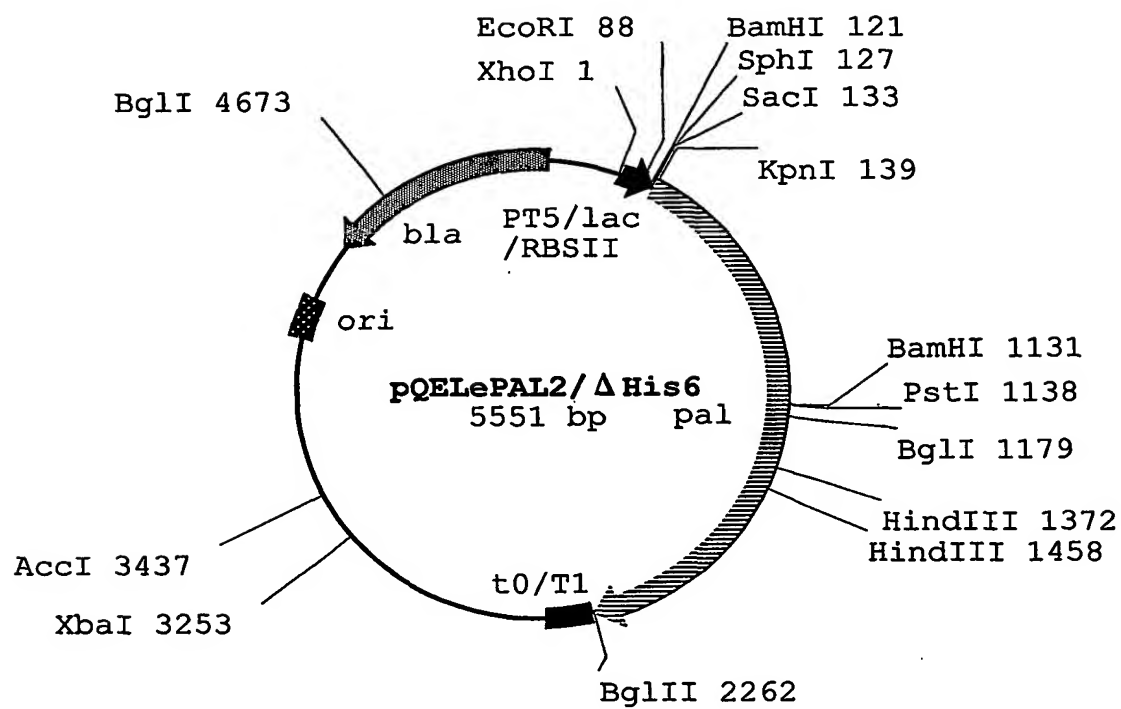
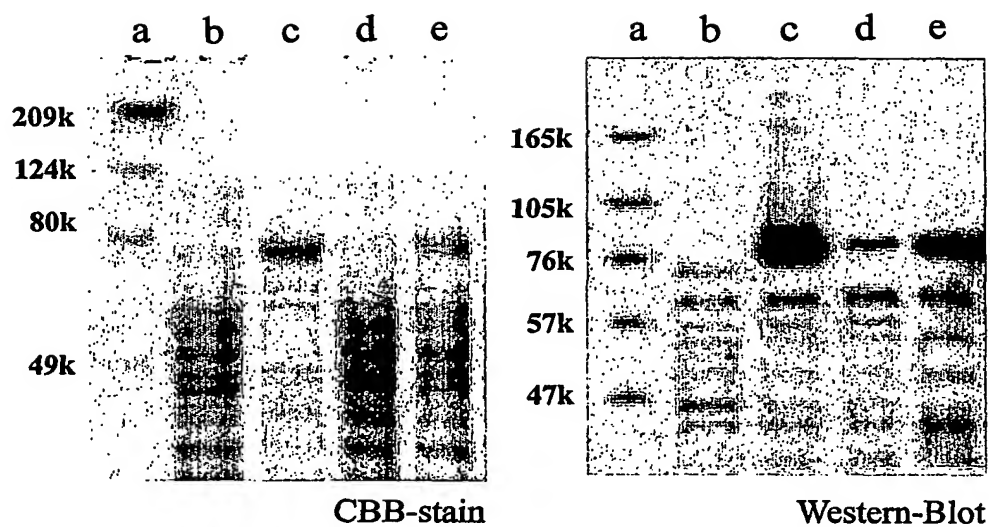


図 2



a; MW maker
 b; *E. coli* XL1Blue(宿主)
 c; No. 16(実施例6, 高活性株)
 d; No. 24(実施例7, 低活性株)
 e; No. 12(実施例7)

10%-20% gradient gel, 40mA, 60min.

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K. K.

<120> Method for screening E. coli strains which exhibit enhanced express
of a foreign gene, such E. coli strains and method for producing protein
or other compounds using the same

<130> SDF4812PCT

<150> JP 2002-360564

<151> 2002-12-12

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> *Lithospermum erythrorhizon*

<400> 1

taagcgtaat tagctgag

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> *Lithospermum erythrorhizon*

<400> 2

agatcgaaga tctaaaca

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N1/21, 9/88, C12P13/04//C12N15/60

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/21, 9/88, C12P13/04//C12N15/60

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JICST)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|---------------------------------------|
| X/A | YAZAKI K. et al., cDNA cloning and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in <i>Lithospermum erythrorhizon</i> , <i>Biosci.Biotechnol.Biochem.</i> , 1997, 61(12), pages 1995 to 2003 | 1, 3-4, 6, 8-13, 17-19/2, 5, 7, 14-16 |
| X/A | BAEDEKER M. et al., Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in <i>Escherichia coli</i> , <i>FEBS Lett.</i> , 1999, 457(1), pages 57 to 60 | 1, 4, 12-13, 17-19/2-3, 5-11, 14-16 |
| P, X | WO 03/000915 A1 (SHOWA DENKO KABUSHIKI KAISHA), 03 January, 2003 (03.01.03), Full text & JP 2003-225092 A | 1, 3-4, 6, 8-13, 17-19 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 18 March, 2004 (18.03.04) | Date of mailing of the international search report 30 March, 2004 (30.03.04) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15882

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|------------------------|
| P, X | Harumi KAMACHI et al., "Shokubutsu Koso Fusei Han'noho ni yoru Hiten'nenkei Amino-san Gosei", BIO INDUSTRY, 12 March, 2003 (12.03.03), 20(3), pages 12 to 20 | 1, 3-4, 6, 8-13, 17-19 |
| A | EP 866132 A2 (HSP RESEARCH INSTITUTE, INC.), 18 March, 1998 (18.03.98), Full text & JP 10-313863 A | 1-19 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/21, 9/88, C12P13/04 // C12N15/60

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N1/21, 9/88, C12P13/04 // C12N15/60

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS(DIALOG)

JSTPlus(JICST)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---|
| X/A | YAZAKI K. et al., cDNA cloning and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in Lithospermum erythrorhizon. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1997, 61(12), p. 1995-2003 | 1, 3-4, 6, 8-13, 17-19 /2, 5, 7, 14-16 |
| X/A | BAEDEKER M. et al., Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in Escherichia coli. FEBS Lett., 1999, 457(1), p. 57-60 | 1, 4, 12-13, 17-19 /2-3, 5-11, 14-16 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 03. 2004

国際調査報告の発送日

30. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

3 1 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| PX | WO 03/000915 A1 (SHOWA DENKO K. K.) 2003. 01. 03 全文 & JP 2003-225092 A | 1, 3-4, 6, 8- 13, 17-19 |
| PX | 蒲池晴美, 他1名, “植物酵素不斉反応法による非天然型アミノ酸合成”, BIO INDUSTRY, 2003. 03. 12, 20(3), p. 12-20 | 1, 3-4, 6, 8- 13, 17-19 |
| A | EP 866132 A2 (HSP RESEARCH INSTITUTE, INC.) 1998. 03. 18 全文 & JP 10-313863 A | 1-19 |